

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**SELEÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS DA CULTIVAR
PRATA-ANÃ PARA RESISTÊNCIA À *Fusarium oxysporum* f. sp.
cubense RAÇA 1**

MILEIDE DOS SANTOS FERREIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO – 2020**

**SELEÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS DA CULTIVAR
PRATA-ANÃ PARA RESISTÊNCIA À *Fusarium oxysporum* f. sp.
cubense RAÇA 1**

MILEIDE DOS SANTOS FERREIRA

Licenciada em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Fernando Haddad

Co-orientador: Dr. Edson Perito Amorim

Co-orientadora: Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

F383s	<p>Ferreira, Mileide dos Santos. Seleção de variantes somaclonais da cultivar 'Prata-Anã' para resistência à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raça 1 / Mileide dos Santos Ferreira, Cruz das Almas, BA, 2020. 51f.; il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Fernando Haddad Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Perito Amorim Co-Orientador: Prof. Dr. Janay Almeida dos Santos-Serejo</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestre em Microbiologia Agrícola.</p> <p>1. Cultivo da Banana. 2. Biotecnologia 3. Melhoramento Vegetal. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.772</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
MILEIDE DOS SANTOS FERREIRA



Dr. Fernando Haddad
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)



Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade
Embrapa Mandioca e Fruticultura



Dr^a Leilane Silveira D'Ávila
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, e a Deus, porque dele, por ele, e para ele, são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus por ter me concedido a oportunidade de ingressar na carreira acadêmica, e ter me abençoado com saúde e sabedoria para caminhar durante esse tempo de muito estudo e dedicação. Por fazer o impossível quando eu precisei, e por me mostrar Sua bondade e amor a cada semestre! Isso tudo confirma ainda mais em meu coração que todas as coisas são e vêm Dele! A Ele meu muito obrigada!

Quero agradecer a Michele Ferreira, minha irmã e melhor amiga. Sou grata por sempre estar comigo, e sempre me ajudar nos momentos que eu achei que não iria conseguir, me motivar nos momentos de desânimo e compartilhar comigo momentos tristes e alegres, de perdas ou conquistas. Muito obrigada!

Agradeço a meus pais, Eliene Santos e Simpliciano Ferreira, por todo cuidado, amor e investimentos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. E por vocês sei que posso continuar sonhando. Amo vocês!

Quero agradecer ao meu Orientador Dr. Fernando Haddad, que sempre acreditou na minha carreira acadêmica, e confiou no meu trabalho, desde a Iniciação científica. Não tenho palavras para agradecer pelo apoio e orientação em todos esses anos de trabalho, muito obrigada!

Gratidão aos meus coorientadores Dr. Edson Amorim e Dr^a Janay Serejo, os quais contribuíram de maneira significativa para este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB, na pessoa da Coordenadora Professora Dr^a Ana Cristina Firmino, por todo préstimo conferido a nós estudantes do programa. Muito obrigada por tudo!

A EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, pela disponibilidade do local para o desenvolvimento do trabalho, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Quero agradecer aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia, em especial ao analista Dr. Leandro Rocha, que sempre esteve disponível para nos ajudar! Muito obrigada!

Também quero agradecer aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, representado pelo Dr. Antônio de Souza, que através de sua paciência e cooperação sempre proporciona ao ambiente de trabalho momentos de comunhão e amizade. Sou muito feliz por fazer parte dessa família! Sou grata a Érica, que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho, com muita dedicação e disponibilidade.

Sou grata a meus Pais Espirituais, Apóstolo Marcondes e Apóstola Karina, pela compressão nas ausências, e por sempre me fazerem sonhar cada vez mais alto, me ensinando a buscar os propósitos de Deus para minha vida, mostrando que sou capaz!

Quero agradecer a todos que participam das reuniões semanais em minha casa, que chamamos de “Nossa Célula”. Onde temos compartilhado momentos tão incríveis, nos quais renovamos nossas forças em Deus, pra continuar seguindo na vida, com alegria, esperança, amor e fé. Em especial a vocês: Juciene, Juliana, Fernanda, Lorena, Zalmar e Irlândia, meu muito obrigada pela presença, alegrias e experiências compartilhadas!

Também quero agradecer a Anelita Rocha, pela amizade e cooperação. Por estar sempre presente, me ajudando e apoiando. Sou grata a Deus por esse presente que é sua amizade!

Enfim, muito obrigada a todos que contribuíram com este trabalho e celebram comigo mais esta conquista. Deus continue abençoando a cada um!

A vocês minha eterna GRATIDÃO!

*Nunca me deixes esquecer que tudo que tenho,
tudo que sou, o que vier a ser, vem de ti Senhor.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de plantas por notas. Plantas da cultivar ‘Prata-Anã’, induzidas a variação somaclonal com o uso de fitoreguladores, para seleção de resistência à murcha de *Fusarium*. Controle (‘Prata-Anã’); BAP: 6-benzilaminopurina; TDZ: Thidiazuron; PBZ: Paclobutrazol; BAP+TDZ: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; BAP+PBZ: 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol; TDZ + PBZ: Thidiazuron + Paclobutrazol; BAP+TDZ+PBZ: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron + Paclobutrazol. Plantas com Nota 1: Ausência de sintomas; Nota 2: rizoma com descoloração inicial; Nota 3: descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema vascular; Nota 4: rizoma com a maioria dos tecidos internos apresentando necrose; Nota 5: rizoma totalmente necrosado (Dita et al. 2014).....48

Figura 2. Heat map da presença (vermelho) e ausência (verde) de sintomas de murcha de *Fusarium* em variantes de bananeira “Prata-Anã” testados em casa de vegetação após indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* raça 1 por variação somaclonal com fitoreguladores. O agrupamento hierárquico dos tratamentos é demonstrado pela árvore à esquerda. T0: controle (‘Prata-Anã’); T1: 6-benzilaminopurina; T2: Thidiazuron; T3: Paclobutrazol; T4: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; T5: 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol; T6: Thidiazuron + Paclobutrazol; T7: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron + Paclobutrazol; TRAT: tratamentos.....49

Figura 3. Observação microscópica do tecido de raízes de plantas de bananeira “Prata-Anã” induzidas por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. Primeira etapa do trabalho. As raízes foram clarificadas e as estruturas do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* foram coradas com Azul de Tripán. Controle ‘Prata-Anã’ sem indução, com colonização e esporulação do patógeno no tecido (A e B); variante T2-1 induzido com Thidiazuron (C); variante T2-2 induzido com Thidiazuron (D); variante T4-1

induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (E); variante T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol. Cla: clamidósporos; Hif: hifas. Segunda etapa do trabalho: controle 'Prata-Anã' sem indução, com colonização e esporulação do patógeno no tecido (G e H); variante T2-1 induzido com Thidiazuron (I); variante T2-2 induzido com Thidiazuron (J); variante T4-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (K); variante T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol (L). Cla: clamidósporos; Hif: hifas.....50

Figura 4. Boxplots da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e índice de doença (ID) de plantas de bananeira “Prata-Anã”, avaliadas em casa de vegetação, após indução por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. T0: controle ‘Prata-Anã’ sem indução; T2-1: variante induzido com Thidiazuron; T2-2: variante induzido com Thidiazuron; T4-1: variante induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; T5-1: variante induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol. As barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Os sintomas externos típicos de amarelecimento foliar são exibidos de A à E. Corte transversal do rizoma demonstrando os sintomas internos de F à J. As plantas foram avaliadas 90 dias após inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça 1 em casa de vegetação. “Prata-Anã” (Controle suscetível) (A, F); variante T2R1 induzida com Thidiazuron (B,G); variante T2R2 induzida com Thidiazuron (C,H); variante T4R1 induzida com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (D,I); variante T5R1 induzida com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol (E,J).....51

Figura 5. Observação morfológica do tecido foliar de plantas de bananeira “Prata-Anã” induzidas por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. Controle ‘Prata-Anã’ sem indução, apresenta manchas avermelhadas na superfície da folha (A); variante T2-1 induzido com Thidiazuron, não apresenta manchas na superfície foliar (B); variante T2-2 induzido com Thidiazuron, não apresenta manchas na superfície foliar (C); variante T4-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron, apresenta manchas avermelhadas na superfície foliar semelhantes a ‘Prata-Anã’ controle (D); variante

T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol, apresenta manchas avermelhadas na superfície foliar semelhantes a 'Prata-Anã' controle (E).....52

ÍNDICE

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO I	17
Revisão de literatura	17
1.A cultura da Bananeira (<i>Musa</i> spp.)	18
2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> agente etiológico da murcha de Fusarium.....	19
3.Resistência genética de plantas	21
4.Programa de Melhoramento Genético da Bananeira - EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.....	22
5.Variação somaclonal	23
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II	31
Seleção de variantes somaclonais da cultivar 'Prata-Anã' para resistência à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raça 1.....	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	35
Indução de variação somaclonal	35
Seleção de variantes somaclonais com resistência a <i>Foc</i>	35
Clareamento e coloração de raízes de bananeira	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
AGRADECIMENTOS	43
REFERÊNCIAS	43
FIGURAS	48

RESUMO

FERREIRA, M. S. **Seleção de variantes somaclonais da cultivar Prata-Anã para resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça 1.** Cruz das Almas, Bahia. 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A murcha de *Fusarium*, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (*Foc*) é uma das mais importantes e destrutivas, que devastam plantações de bananeira em todo o mundo. No Brasil há apenas a raça 1 do patógeno, mas em outros países há também a raça 4 tropical. Atualmente a Colômbia registrou casos da raça 4, indicando a chegada do fungo nas américas. As cultivares de bananeira no Brasil em especial as cultivares do subgrupo Prata, tem apresentado problemas com a raça 1, especialmente nos perímetros irrigados, onde concentra-se grande parte da produção desse tipo de bananeira. Não existe controle químico eficiente para a doença, em locais onde há alta pressão de inóculo e às estratégias de manejo como o uso de controle biológico não forem eficientes, a melhor solução é o uso de variedades resistentes. Nesse sentido a indução de variação somaclonal em bananeira mostra-se como uma alternativa de melhoramento genético. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi obter genótipos de bananeira da cultivar 'Prata-Anã' resistentes à murcha de *Fusarium* pela indução de variação somaclonal. Foi realizada a indução de variação somaclonal em cultivares de 'Prata-Anã', com a utilização de reguladores vegetais. Os explantes foram submetidos ao meio de cultura MS, suplementado com combinações de reguladores vegetais: 6-benzilaminopurina (BAP), Thidiazuron (TDZ) e Paclobutrazol (PBZ). Os variantes obtidos foram plantados em caixas d'água contendo solo infestado com *Foc*, e avaliados quanto à resistência ao patógeno. O trabalho selecionou os variantes T2-1 e T2-2 como resistentes. As mesmas obtiveram notas inferiores de AACPD e ID na avaliação de doença, em comparação com o controle. A ferramenta de indução a variação somaclonal é promissora no desenvolvimento de novas variedades de bananeira resistentes a murcha de *Fusarium*.

Palavras-chave: *Musa* spp., Resistência genética, Cultura de tecidos.

ABSTRACT

FERREIRA, M. S. **Selection of somaclonal variants of the Prata-Anã for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 1.** Cruz das Almas, Bahia. 2020. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology). Federal University of Recôncavo da Bahia.

Fusarium wilt, a disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) is one of the most important and destructive, that devastate banana plants worldwide. In Brazil there is only one race 1 of pathogen, but in other countries there is also a tropical race 4. Currently, in Colombia, we register cases of race 4, indicating the arrival of the fungus in the Americas. How to grow banana in Brazil, especially how to grow subgroup Prata, has problems with race 1, especially in the irrigated periods, where the production of this type of banana is concentrated in great part. There is no efficient chemical control for the disease, in places where the node is elevated and management strategies, as the use of biological control is no longer efficient, the best solution is the use of resistant varieties. In this sense, the induction of somaclonal variation in banana shows as an alternative for genetic improvement. Therefore, the objective of this work was to obtain banana genotypes of the cultivar 'Prata-Anã' resistant to Fusarium wilt by inducing somaclonal variation. An induction of somaclonal variation was performed in cultivars of 'Prata-Anã', with the use of plant regulators. The explants were used in the MS culture medium, supplemented with combinations of plant regulators: 6-benzylaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ) and Paclobutrazol (PBZ). The selected variants were planted in water tanks containing only Foc infested, and reduced for resistance to the pathogen. The work selects the variants T2-1 and T2-2 as resistant. How to obtain lower grades of AACPD and ID in the assessment of disease, compared to control. A somaclonal variation induction tool is promising in the development of new banana varieties resistant to Fusarium wilt.

Keywords: *Musa* spp., Genetic resistance, Tissue culture.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* sp.) é uma das fruteiras mais consumidas no mundo, sendo base na alimentação para os países em desenvolvimento. A América Latina e Caribe são responsáveis por cerca de 75% das exportações mundiais. Em 2017, a produção mundial alcançou aproximadamente 115 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). O Brasil é o quarto país que mais produz a fruta. A bananeira é cultivada em todos os estados brasileiros, com destaque para os estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina. Em 2017, a área cultivada com bananeira foi cerca de 517 mil hectares (IBGE, 2019). Nas regiões Norte e Nordeste a cultivar Prata é uma das mais consumidas (SILVA et al. 2016).

No entanto, esses dados podem ser limitados por fatores que reduzem a produção de bananeira, como doenças causadas por fitopatógenos. Dentre as doenças que afetam essa cultura destaca-se a Murcha de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), responsável por causar danos nas plantações de bananeira em todo mundo. O patógeno é um fungo habitante do solo capaz de sobreviver por muitos anos devido à produção de estruturas de resistência, denominadas clamidósporos (PLOETZ 2015).

As bananeiras podem ser afetadas por três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), as quais são distinguidas por cultivares diferenciadoras. A raça 1 afeta o subgrupo Gros Michel, a raça 2 afeta o subgrupo Bluggoe, e a raça 4 (TR4) afeta as cultivares do subgrupo Cavendish e todas as demais cultivares. No Brasil ocorrem as raças 1 e 2 do patógeno. Na África, Ásia e Oceania ocorre também a raça 4 tropical (TR4) e relatos recentes confirmam a chegada desta raça na Colômbia (GARCIA-BASTIDAS et al., 2019).

Atualmente, no Brasil, as cultivares do subgrupo Prata destacam-se em produção devido à preferência para o consumo interno. Contudo, essas são suscetíveis a raça 1 do patógeno, tornando-se fundamental o desenvolvimento de estratégias de controle da doença. Para isso, em áreas onde o fungo está estabelecido, a melhor maneira para mitigar os danos causados pela doença é a utilização de variedades resistentes (PLOETZ 2015; REBOUÇAS et al. 2018; BUBICI et al. 2019).

Na Biotecnologia, a cultura de tecidos possui técnicas que fornecem ferramentas para o avanço na área de melhoramento genético de plantas, que incluem a ferramenta de indução de variação somaclonal, a partir do uso de reguladores de vegetais, e estresses provocados na cultura *in vitro* (HWANG e KO 2004). A variação somaclonal ocorre na cultura de tecidos ao induzir uma variação genética no cultivo *in vitro* da bananeira. Estas modificações podem ser de origem genéticas ou epigenética. As modificações genéticas no DNA contribuem para formação de proteínas que podem gerar possíveis características desejáveis para o melhoramento genético resistentes a patógenos, contribuindo no controle da doença. As modificações epigenéticas ocorrem quimicamente, como metilações ou acetilação que não alteram a sequência de bases do DNA, são herdáveis e instáveis. Genes relacionados com a resistência ou de suscetibilidade da planta podem ser ativados (acetilação) ou podem ser desativados (metilação).

Esta estratégia vem sendo utilizada com sucesso no Taiwan Banana Research Institute (TBRI), onde variantes somaclonais resistentes à Raça 4 de *Fusarium*, foram obtidos a partir de cultivares do subgrupo Cavendish (HWANG, 2004).

A fim de contribuir com o programa de melhoramento da bananeira, a ferramenta de variação somaclonal tem sido implementada como uma nova linha de pesquisa para o programa de melhoramento da bananeira da Embrapa.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi a indução e seleção de variantes somaclonais da cultivar 'Prata-Anã' para resistência à murcha de *Fusarium* raça 1.

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

1. A cultura da Bananeira (*Musa* spp.)

A banana (*Musa* spp.) é uma espécie monocotiledônea pertencente à família botânica *Musaceae*, com centro de origem no sudeste asiático e oeste do Pacífico. A maioria das cultivares de bananeira e plátanos tiveram sua origem no cruzamento natural entre as espécies selvagens diploides *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955; HAKKIINEN, 2013).

A bananeira é uma planta herbácea, caracterizada pela exuberância de suas formas e dimensão das folhas. No centro da copa emerge a inflorescência com brácteas ovaladas de coloração normalmente roxo avermelhada. A união das bainhas foliares da origem ao pseudocaule. O rizoma ou caule subterrâneo é a parte da bananeira onde todos os seus órgãos estão apoiados, neste local existe a região meristemática, em que pela técnica da cultura de tecidos, é possível a introdução de mudas *in vitro* para indução de brotação, a fim de se obter clones da mesma planta. As raízes da bananeira são do tipo fasciculada, em que não apresenta raiz principal (DONATO et al., 2006; DANTAS et al., 2016).

A bananeira é uma fruteira de grande interesse econômico na agricultura (PERRIER et al., 2011), possui alto teor nutricional, fonte de sais minerais, principalmente o potássio, e vitaminas, C, A, B2, B6 e outras (ÁLVARES et al., 2003).

A banana é uma fruta versátil em termos de consumo, sendo consumida in natura, frita, cozida, processada, e possui características agradáveis de aroma, sabor, valor nutricional e facilidade de consumo e preço, tornando-se por esses motivos uma fruta popular no mundo (BOLFARINI et al., 2016).

No mundo em torno de 114,13 milhões de toneladas da fruta são produzidas por ano. Tornando-se base da alimentação para os países em desenvolvimento. A produção mundial de banana em 2017 foi de 113,28 milhões de toneladas com valor bruto de produção em torno de 36 bilhões de dólares (FAOSTAT, 2019). O Brasil ocupa a quarta posição dentre os países produtores da fruta, tendo produzido aproximadamente 6,7 milhões de toneladas em 2016, o que correspondeu a um valor bruto de 3,4 bilhões de dólares (FAOSTAT, 2019).

A fruta é produzida em todas as regiões, com destaque para os estados de São Paulo, Bahia e Minas Gerais. As regiões Nordeste, Sudeste e Sul se destacaram na produção de banana em 2018. A região Nordeste se destacou

com uma produção de 33,8%, a região Sudeste alcançou 32% da produção, e a região Sul 15,3% (IBGE, 2019).

Muitas doenças afetam a produção dessa cultura, no entanto a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* é uma das doenças que mais afetam a produção de banana (PLOETZ, 2006). Essa doença é endêmica em todas as regiões produtoras de banana, e a utilização de métodos químicos para o controle da doença é inviável, onde é grande a pressão do inóculo, e métodos de controle não conseguem ser eficiente nessas áreas, o que torna a utilização de variedades resistentes à melhor medida no controle da doença.

2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* agente etiológico da murcha de *Fusarium*.

Fusarium corresponde a um gênero de fungos que possui alta capacidade de sobrevivência saprofítica, estratégia no qual passa a maior parte da sua vida no solo (AGRIOS, 2005). O patógeno produz microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios apresentam formas variáveis, sendo ovais ou cilíndrico-elipsoidais, retos ou curvos, e medem de 5 a 12 μ de comprimento e de 2,2 a 3,5 μ de largura. Os macroconídios originam-se de conidióforos ramificados ou de esporodóquios, são fusóides e pontiagudos nas duas extremidades, apresentam paredes finas e de três a sete septos. Os macroconídios com três septos são mais comuns e têm de 27 a 46 μ de comprimento e de 3,0 a 4,5 μ de largura. Os clamidósporos com paredes lisas ou rugosas são terminais ou intercalares, geralmente solitários, mas, ocasionalmente, em pares ou cadeias (BOOTH, 1971). Esta estrutura de resistência pode sobreviver no solo na ausência de hospedeiro por décadas (STOVER, 1972).

O micélio também pode sobreviver em restos culturais e se desenvolver em diversas espécies vegetais que atuam como hospedeiras. Grande parte das espécies dos fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* causam doenças graves em plantas no mundo inteiro.

Na bananeira, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é o causador da murcha de *Fusarium*, considerada uma das mais destrutivas doenças desta cultura. Após 12 a 24 horas da inoculação, os esporos do fungo emitem um ou

dois tubos germinativos, os quais crescem em direção às raízes ou ao hipocótilo, dependendo do local da deposição do inóculo (LÓPEZ-DUQUE & MÜLLER, 1969). Após a penetração do fungo nos tecidos da raiz da planta, ele coloniza e bloqueia o sistema vascular, isso provoca uma coloração marrom-avermelhada que causa a descoloração do rizoma. Externamente os sintomas apresentam rachaduras no pseudocaule, um amarelecimento foliar, que inicia das bordas até chegar ao limbo foliar, e a quebra das folhas apresentando um aspecto de guarda-chuva fechado, os sintomas progridem até a morte da planta (PÉREZ-VICENTE, 2004; HUIYUN FAN et al., 2017; DITA et al., 2018). O progresso da doença só é paralisado em cultivares resistentes, provavelmente devido a alterações químicas ou estruturais do tecido do hospedeiro (MACE et al., 1981).

Na Austrália nos anos de 1897 ocorreu o primeiro relato de epidemia da murcha de *Fusarium*, que devastou as plantações de bananeira do tipo Gros Michel. Os prejuízos provocados pela epidemia chegaram a US \$ 2,3 bilhões (PLOETZ 2015). A solução para esse problema foi a substituição da cultivar Gros Michel por cultivares resistentes a raça 1 do patógeno, pertencentes ao subgrupo Cavendish (PLOETZ 2006).

No Brasil o primeiro relato da doença ocorreu na cidade de Piracicaba no estado de São Paulo, no ano de 1930. As plantações de bananeira da cultivar Maçã foram completamente destruídas pela doença, e substituídas por bananeiras do subgrupo Cavendish. O patógeno está presente em quase todos os lugares em que se cultiva banana no mundo, os agricultores têm enfrentado muitos desafios no que diz respeito ao impacto causado pela doença nas plantações. Essa dificuldade em manejar a doença afeta a renda do agricultor como também a expansão do cultivo. A utilização de cultivares suscetíveis em áreas com a presença de *Fusarium* tem causado perdas que chegam a 100% na produção (JAMIL et al., 2019).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* apresenta especialização a nível de raça de acordo com a habilidade de infectar diferentes cultivares diferenciadas, podendo ser classificadas em raça 1, 2 e 4. Essa classificação está relacionada à capacidade do patógeno em causar doença em certos cultivares de bananeira (PLOETZ, 2006; HUIYUN FAN et al., 2017).

A raça 1 do patógeno ataca o grupo "Gros Michel" (*Musa* spp., grupo AAA), a raça 2 afeta "Bluggoe" (*Musa* spp., grupo ABB) e a sua cultivares relacionadas,

a raça 4 causa doença à maioria das cultivares de banana "Cavendish" (*Musa* spp., grupo AAA) (PENNA et al., 2019).

Os casos de infecção na variedade Cavendish estão relacionados a plantas que sofriam algum tipo de stress, no entanto plantações de Cavendish no sudoeste Asiático foram totalmente devastadas, mesmo não apresentando stress, surgindo assim a Raça Tropical 4 (Tr4) (HUNG et al., 2017; CHITTARATH et al., 2018; ZHENG et al., 2018). A Raça Tropical 4 (Tr4) foi caracterizada por abranger as populações patogênicas de *Foc*, que infectam cultivares Cavendish, tanto em condições tropicais como subtropicais e demais cultivares que são afetadas pelas raças 1 e 2. A Raça Subtropical 4 (SR4) foi caracterizada para indicar os casos de infecção em cultivares Cavendish relacionados a plantas que passaram por algum tipo de stress em plantios de bananeira de regiões subtropicais (PLOETZ, 2015). A alta variabilidade genética da população de *Foc* contribui para o aparecimento de novas raças do patógeno (AGUILAR-HAWOD et al., 2020).

Desta maneira a chegada da Raça Tropical TR4 na Colômbia coloca o Brasil em alerta, sabendo-se que praticamente todas as variedades cultivadas no Brasil são suscetíveis ao patógeno (COSTA et. al, 2015).

Neste sentido é de fundamental importância estratégias integradas, que proporcione práticas mais eficientes de controle do patógeno. Diante disto, em terrenos com a presença do fungo, e onde controle biológico não foi eficaz, a tecnologia mais eficiente para o controle da doença é a utilização de variedades resistentes (RIBEIRO et al., 2018).

3. Resistência genética de plantas

A resistência de plantas aos microrganismos é regra na natureza, enquanto que a suscetibilidade a alguns microrganismos são exceção, isto é caracterizado como resistência a não hospedeiro (RNH). Esta resistência de não hospedeiro de determinadas espécies vegetais a determinados microrganismos, não fazem parte do círculo de hospedeiros de determinados fitopatógenos, não sendo possível a invasão do patógeno nessas espécies de plantas (CERESINI et al., 2018).

A resistência de hospedeiro (RH) é caracterizada por espécies de plantas que são hospedeiras de determinados fitopatógenos. Ao ser invadido pelo

patógeno o hospedeiro pode não resistir ao ataque (suscetível) ou pode resistir, seja atrasando a infecção ou não permitindo que o processo de infecção seja estabelecido. Isso ocorre por meio de mecanismos de defesa da planta (resistente) (SWARUPA et al., 2014).

O Ácido salicílico (SA), etileno e ácido jasmônico são os principais hormônios envolvidos na sinalização do sistema de defesa das plantas, dependendo do estilo de vida do patógeno envolvido. Outros hormônios, como ácido abscísico e citocininas, também têm emergido como participantes das vias de sinalização para a defesa (PORTAL et al., 2018).

Mecanismos físicos e bioquímicos presentes na planta podem determinar a resistência a determinados microrganismos. Os mecanismos podem ser pré-formados ou pós-formados. Os mecanismos pré-formados constituem barreiras físicas ou bioquímicas que já existem na planta, atuam antes da presença do patógeno e funcionam sem a necessidade de serem ativados. Pode ser, por exemplo, uma barreira formada pela cutícula e pela parede celular, ou compostos fenólicos presentes na planta, e é considerado importante fator para a RNH (LI et al. 2013b; LU et al. 2013).

Os mecanismos pós-formados são barreiras físicas ou bioquímicas, que começam a atuar na planta, após o fitopatógenos invadir o tecido. Podem provocar alterações citoplasmáticas, formação de halos, lignificação, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses entre outras respostas bioquímicas. Todos esses mecanismos descritos anteriormente podem atuar em conjunto ou de maneira isolada na defesa da planta (DI et al. 2006; DE LORENZO et al. 2001).

Diante disto, uma variabilidade genética de genótipos pode ser gerada pela indução de variação, por fatores químicos (mutagênicos) e físicos (radiações), gerando genótipos com resistência a doenças (JAIN, 2002).

A seleção de genótipos para resistência a doenças e pragas, é um desafio para os programas de melhoramento e novas ferramentas tem se mostrado promissoras.

4. Programa de Melhoramento Genético da Bananeira - EMBRAPA Mandioca e Fruticultura

Os programas de melhoramento genético de bananeira visam o desenvolvimento de genótipos resistentes as principais doenças e pragas, e características agronômicas desejáveis a produção e consumo desta fruteira.

Com as perdas nas plantações de bananeira, provocadas pela murcha de *Fusarium* em alguns países, vários centros de pesquisa criaram programas voltados para o melhoramento da bananeira no mundo. No Brasil, a Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em Cruz das Almas-BA, a Embrapa Mandioca e Fruticultura, desde 1976 vem trabalhando no desenvolvimento de novas cultivares e, já foram desenvolvidas diversas variedades por meio de hibridação como a BRS Caprichosa, BRS Preciosa, BRS Pacovan Ken, BRS Japira, BRS Platina, BRS Tropical, e a BRS Princesa. A BRS Princesa é um híbrido tetraploide do tipo Maçã, resistente a murcha de *Fusarium* raça 1, e com resistência à Sigatoka-negra, e tem sido cultivada por produtores no Brasil (AMORIM et al., 2016).

O melhoramento genético tradicional como a hibridação é um trabalho demorado e complexo, sendo que o longo ciclo da cultura e esterilidade do fruto contribuem para essa dificuldade (SILVA et al., 2013).

Na Biotecnologia a variação somaclonal é uma das ferramentas que tem sido utilizada na geração de genótipos resistentes. Alguns genótipos de bananeira do subgrupo Cavendish resistentes a raça 4 de *Fusarium*, foram desenvolvidos com essa ferramenta em Taiwan (HWANG e KO, 2004). E essa é a mais recente ferramenta utilizada no programa de melhoramento genético da bananeira, na Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA.

5. Variação somaclonal

A variação somaclonal corresponde a alterações que podem ser do tipo genética ou epigenética, e são induzidas em células vegetais por meio da cultura de tecidos (PENNA et al 2019; ANIL et. al, 2018). Variabilidade deste tipo, geralmente ocorre espontaneamente e é amplamente descontrolado ou direcionado, pode ser de dois tipos diferentes. As alterações genéticas que ocorrem na variação somaclonal mudam a sequência da base do DNA, correspondendo a mutações que podem ser: deleções, inserções, substituição de

base e demais eventos que ocorrem na divisão celular. Essas alterações são herdáveis e geram mutantes.

As alterações epigenéticas são herdáveis, entretanto não modificam as bases dos nucleotídeos. Ocorrem metilações e alterações em histonas que podem ser reversíveis (ANIL et. al, 2018). São alterações temporárias nas células ou tecidos, induzidas genética ou ambientalmente.

A indução de variação somaclonal na cultura de tecidos é uma ferramenta que pode gerar genótipos com características úteis para o melhoramento genético, a partir da utilização de fitoreguladores vegetais no meio de cultivo, que induzem a variabilidade genética (SHEIDAI, M et. al, 2010). Concentrações e proporções precisas de auxinas e citocininas são fundamentais para uma micropropagação eficiente. Alterações nas proporções desses reguladores vegetais podem induzir variabilidade (BAIRU, et. al, 2011).

A 6-benzilaminopurina (BAP), é uma citocinina sintética, que pode estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas e a divisão celular. O Thidiazuron (TDZ) mostra uma atividade de citocinina, atuando na divisão celular, em alguns trabalhos se mostra mais eficiente do que o BAP. Paclobutrazol (PBZ), um membro da família dos triazóis, é inibidor de Giberélinas que inibe o crescimento da planta e estimula a floração e brotação. Esses reguladores utilizados em concentrações maiores podem provocar variações *in vitro* na planta (RAZANI, et. al, 2019).

O número de subcultivos contribui para o aumento da taxa de variação somaclonal. Além disso, alguns fatores externos podem influenciar o ciclo celular em plantas, provocando um ciclo *in vitro* anormal, como: taxa de agitação de meio de cultivo, reguladores de crescimento, luz, e temperatura podem causar variação somaclonal (RAZANI, et. al, 2019). Além disso, variações geradas em situação *in vitro* costuma ocorrer com mais frequência, ao contrário das mutações espontâneas *in vivo* (YANG et al. 2010).

Rodrigues et al. (1998) mostraram que a incidência de variação somaclonal aumentou de 1,3% (quinto subcultivo) para 3,8% após 11 subcultivos. Isso indica que a partir do quinto subcultivo variantes somaclonais podem surgir. A rápida multiplicação de um tecido pode afetar a estabilidade genética levando a variação somaclonal (ISRAELI et al. 1995).

A variabilidade genética provocada pela indução de variação somaclonal é promissora. Essa ferramenta tem sido usada nos últimos anos em diversas culturas, por programas de melhoramento em alguns países no mundo, para gerar variedades resistentes. Nesse sentido entende-se que o uso da variação somaclonal em bananeira é um método promissor e pode contribuir para seleção de genótipos resistentes.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, v. 4, 2005 952p.

AGUILAR-HAWOD, K. G. I., DE LA CUEVA, F. M., & CUMAGUN, C. J. R. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* causing Panama wilt of banana in the Philippines. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 32, 2020.

ÁLVARES, V. DE S. Amadurecimento e qualidade da banana “Prata”(Musa AAB subgrupo Prata) submetida a diferentes concentrações de etileno. **Embrapa Acre-Tese/dissertação (ALICE)**, 2003. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/10289>.

AMORIM, E. P.; SEREJO, J. A. dos S.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Melhoramento genético. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**, Brasília, DF: Embrapa, p. 171-200, 2016.

ANIL, V.S.; LOBO S.; BENNUR S. Somaclonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants in vitro. **Plant Science Today**, v. 5, n. 2, p. 44-54, 2018.

BAIRU, Michael W.; AREMU, Adeyemi O.; VAN STADEN, Johannes. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BOLFARINI, A. C. B.; LEONEL, S.; LEONEL, M.; TECCHIO, M. A.; SILVA, M. S.; SOUZA, J. M. A. 2016. Growth, yield and fruit quality of Maçã banana under different rates of phosphorus fertilization. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 9, p. 1368, 2016.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237p.

BUBICI G.; KAUSHAL M.; PRIGIGALLO MI.; GÓMEZ-LAMA CC.; MERCADO-BLANCO J. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 616, 2019.

CERESINI, P. C., DEBONA, D., RODRIGUES, F., GUIMARÃES, L. M., THUROW, L., MÖLLER, P., ... & EIRAS, M. **Resistência genética de plantas a patógenos**. 239: 735, 2018. Ed. UFPEL, Pelotas, p. 437, 2018.

CHITTARATH, K.; MOSTERT, D.; CREW, K.S.; VILJOEN, A.; KONG, G.; MOLINA, A. B.; THOMAS, J. E. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (VCG 01213/16) associated with Cavendish bananas in Laos. **Plant Disease**, v.102, n.2, p.449, 2018.

COSTA, S.N.; BRAGANÇA, C.A.D.; RIBEIRO, L.R.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; DITA, M.A.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in different regions from Brazil. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 137-146, 2015.

DANTAS, A.C.V.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Estrutura da planta. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**, Brasília, DF: Embrapa, p. 29-44, 2016.

DE LORENZO G, D'OVIDIO R, CERVONE F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 313-335, 2001.

DI C, ZHANG M, XU S, CHENG T, AN L. Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 91-100, 2006.

DITA, M., M. BARQUERO, D. HECK, E.S.G. MIZUBUTI, AND C.P. STAVER. Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 1468, 2018.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. O.; LUCCA FILHO, O. A.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. S. Correlação entre caracteres da planta e do cacho em bananeira (*Musa* spp). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 21-30, 2006.

FAN, H., DONG, H., XU, C., LIU, J., HU, B., YE, J. & LI, H. (2017). Pectin methylesterases contribute the pathogenic differences between races 1 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13140, 2017.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 14 Jan. 2020.

FOOD, AGRICULTURE ORGANIZATION FAO (2019): **Banana Market Review Preliminary Results for 2019**. Available at: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>. Accessed on May 8, 2019.

FAOSTAT. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E> Acesso em: 18 de Janeiro, 2020.

HAKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809-813, 2013.

HUNG, T. N.; JUNG, N.Q.; MOSTERT, D.; VILJOEN, A.; CHAO, C. P.; MOLINA, A. B. First report of Fusarium wilt of Cavendish bananas, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (VCG 01213/16) in Vietnam. **Plant Disease**, v.102, n.2, p. 448, 2017.

HWANG, S. C.; KO, W. H. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. **Plant Disease**, v. 88, n. 6, p. 580-588, 2004.

Hwang, S.C. FORMOSANA: a new Cavendish variety with super high yield and *Fusarium* wilt resistance selected by somaclonal variation. **TBRI, Taiwan**, 2002.

HWANG, S. C., KO, W. H. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. **Plant Disease**, v. 88, n. 6, p. 580-588, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE: **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano civil.** Available at: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemtico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo_Indicadores_IBGE/20 9/. Acessado em: Ago 7, 2019.

ISRAELI, Y., LAHAV, E., REUVENI, O. In vitro culture of bananas. In: Gowen S (ed) *Bananas and plantians*. **Chapman and Hall**, London, pp 147–178, 1995.

JAIN, S.M. A review of induction of mutations in fruits of tropical and subtropical regions. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.575, p.295-302, 2002.

JAMIL, F. N., TANG, C. N., SAIDI, N. B., LAI, K. S., & BAHARUM, N. A. *Fusarium* Wilt in Banana: Epidemics and Management Strategies. In: **Horticulture**. IntechOpen, p. 28, 2019.

LI X, BAI T, LI Y, RUAN X, LI H. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* tropical race 4-inoculated response to *Fusarium* wilts in the banana root cells. **Proteome Science**, v. 11, n. 1, p. 41, 2013.

LU Y, LIAO D, PU J, QI Y, XIE Y. Proteome analysis of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp.*ubense*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 163-171, 2013.

MACE, M.E.; BELL, A.A.; BECKMAN, C.H. (Eds). *Fungal wilt diseases of plants*. **Academic Press**, New York, p. 640, 1981.

MÜLLER, L.E.; DONGO-D., S.L. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium.yspori* f. *phaseoli* en el frijol. n. Pruebas varietales. **Thrrialba**, San José, v.19, p.82-90, 1969.

PENNA, S., GHAG, S. B., GANAPATHI, T. R., & JAIN, S. M. (2019). Induced Genetic Diversity in Banana. In: **Genetic Diversity in Horticultural Plants**. Springer, Cham, p. 273-297, 2019.

PÉREZ-VICENTE L.; DITA, M.A.; MARTÍNEZ-DE LA, P.E. Technical Manual: Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused

by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* Tropical Race 4 (TR4). **Editora FAO**, Italy, 75p. 2014.

PERRIER, X.; DE LANGHE E.; DONOHUE M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J. P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A. M.; TOMKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; DE MARET, P.; DENHAM, T. Multidiciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R.C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.

PORTAL, N., SOLER, A., ALPHONSINE, P. A. M., BORRAS-HIDALGO, O., PORTIELES, R., PEÑA-RODRIGUEZ, L. M & WALTON, J. D. Nonspecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* race 1. **Plant Pathology**, v. 67, n. 2, p. 467-476, 2018.

RAZANI, M., KAYAT, F., REDWAN, R. M., & SUSANTO, D. Effect of Somaclonal Variation in *Musa acuminata* cv. Berangan Through Micropropagation Using RAPD. **Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 9-14, 2019.

REBOUÇAS, T. A., HADDAD, F., FERREIRA, C. F., OLIVEIRA, S. A. S., LEDO, C. A. S., & AMORIM, E. P. Identification of banana genotypes resistant to Fusarium wilt race 1 under field and greenhouse conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 308-313, 2018.

RODRIGUES, P.H.V., TULMANN NETO, A., CASSIERI NETO, P., MENDES, B.M.J. Influence of the number of subcultures on somoclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). *Acta Horticultural* 490:469–473, 1998.

SHEIDAI, M., AMINPOOR, H., NOORMOHAMMADI, Z., & FARAHANI, F. Genetic variation induced by tissue culture in Banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Cavandish Dwarf. **Geneconserve**, v. 19, p. 1-10, 2010.

SILVA, M.J.R.D.; SANTOS, L.D.S.; PEREIRA, M.D.C.; GOMES, I.D.S.; MACHADO, M.; RIBEIRO, V.G. Yield and fruit quality of the banana trees 'Pacovan Ken' and PA94-01 genotype in two productive cycles. **Revista Ceres**, v. 63, n. 6, p. 836-842, 2016.

SILVA, S.O. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The journal of the Linnean Society of London**, London, v. 55, p. 302-12, 1955.

STOVER, R.H. Studies on Fusarium wilt of bananas: VIII. Differentiation of clones by cultural interaction and volatile substances. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 11, p. 1467-1471, 1962.

YANG W-R, ZHANG Q-X, PAN H-T, SUN M In vitro regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. **Propag Ornam Plants** 10:59–66, 2010.

ZHENG, S. J.; GARCÍA-BASTIDAS, F. A.; LI, X. D.; ZENG, L., BAI, T. T.; XU, S. T.; YIN, K. S.; LI, H. X. X.; FU, G.; YU, Y.C.; YANG, L.; NGUYEN, H.C.; DOUANGBOUPHA, B.; KHAING, A. A.; DRENTH, A.; SEIDL, M. F.; MEIJER, H. G. J.; KEMA, G. H. J. New incursions of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical Race 4 across the Greater Mekong Subregion. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.5, p.208-218, 2018.

CAPÍTULO II

Seleção de variantes somaclonais da cultivar 'Prata-Anã' para resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça 1.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Fruticultura (RBF)

1 Seleção de variantes somaclonais da cultivar ‘Prata-Anã’ para resistência à

2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça 1

3 Mileide dos Santos Ferreira¹, Edson Perito Amorim², Janay Almeida dos Santos-

4 Serejo³, Fernando Haddad⁴

5 **RESUMO**

6
7 A bananeira é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo, entretanto algumas
8 doenças tem afetado sua produção, como a murcha de *Fusarium*. Em áreas onde há
9 pressão de inóculo a medida mais adequada no controle da doença é a utilização de
10 variedades resistentes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi obter genótipos de
11 bananeira da cultivar ‘Prata-Anã’ resistentes à murcha de *Fusarium* pela indução de
12 variação somaclonal. Para isso, explantes da cultivar ‘Prata-Anã’ foram submetidos
13 ao meio de cultura MS suplementado com combinações de reguladores vegetais: 6-
14 benzilaminopurina (BAP), Thidiazuron (TDZ) e Paclobutrazol (PBZ). As plantas
15 regeneradas foram plantadas em caixas d’água contendo solo infestado com *Foc*, e
16 avaliados quanto à resistência ao patógeno. Neste trabalho os variantes somaclonais
17 T2-1 e T2-2 do tratamento 2 com TDZ foram selecionados como resistentes. Esse
18 resultado é promissor para o lançamento de uma nova variedade de bananeira
19 resistente à murcha de *Fusarium* raça 1.

20
21 **PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia; Cultura de tecidos; *Musa* sp.

¹ Licenciada em Biologia, Estudante de Mestrando em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, E-mail: mileideferreira12@gmail.com

² Agrônomo, Pesquisador Doutor da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. E-mail: edson.amorim@embrapa.br

³ Agrônoma, Pesquisadora Doutora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. E-mail: janay.almeida@embrapa.br

⁴ Agrônomo, Pesquisador Doutor da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. E-mail: fernando.haddad@embrapa.br

24 Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata-Anã' for resistance to
25 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1

26 **ABSTRACT**

27

28 Banana tree is one of the most cultivated fruits in the world, however some diseases
29 affect its production, such as Fusarium wilt. In areas where there is inoculum
30 pressure, the most appropriate measure for disease control it's the use of resistant
31 varieties. Therefore, the objective of this work was to obtain genotypes of banana
32 tree the cultivar 'Prata-Anã' resistant to Fusarium wilt by induction of somaclonal
33 variation. For this, explant of the cultivar 'Prata-Anã' were submitted to the culture
34 medium MS supplemented with combinations of plant regulators: 6-
35 benzylaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ) and Paclobutrazol (PBZ). The
36 regenerated plants were planted in tanks, containing soil infested with Foc, and
37 evaluated for resistanceto the pathogen. In this work, the variants T2-1 and T2-2 of
38 treatment 2 with TDZ were selected as resistant. This result is promising for the
39 launch of a new wilt-resistant banana variety of Fusarium race 1.

40

41 **KEYWORDS:** Biotechnology; Fabric culture; Musa sp.

42 **INTRODUÇÃO**

43

44 A banana é fonte de nutrientes para famílias em vários países em
45 desenvolvimento. No Brasil todas as regiões produzem a fruta. Nos últimos anos as
46 cultivares do subgrupo Prata, como o clone 'Prata-Anã', seguido por 'Gorutuba' e
47 'Catarina', têm sido à base da produção de banana no Brasil. No entanto, tem sido
48 identificado um aumento na incidência da murcha de Fusarium na cultivar 'Prata-
49 Anã', sendo ela a variedade com maior área plantada no país, e que é suscetível a
50 doença (HADDAD et al., 2015).

51 A murcha de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp.
52 *cubense* (Foc), é considerada a doença mais destrutiva da bananeira (REBOUÇAS

53 et al., 2018). O fungo é habitante do solo, com alta capacidade saprofítica,
54 sobrevivendo no solo por longos períodos, utilizando para tanto, estruturas de
55 resistência, denominadas clamidósporos (STOVER, 1962; PLOETZ, 2015).

56 No Brasil, a doença causa grande impacto, seja reduzindo produtividade ou
57 inviabilizando terras para o plantio. A utilização da variedade Cavendish controlou
58 os danos causados pela raça 1 no Brasil. No entanto, a possibilidade de chegada da
59 raça 4 tropical de *Foc* no país é um grande desafio para o melhoramento genético.
60 A raça tropical 4 tem causado perdas na produção de banana do subgrupo
61 Cavendish em vários países no mundo (ZHENG et al., 2018). Com a recente
62 identificação da raça tropical 4 na Colômbia, a possibilidade de entrada do patógeno
63 do Brasil é uma realidade, que pode não estar muito distante.

64 Nos últimos anos, a variação somaclonal tem sido utilizada para o
65 desenvolvido de novos genótipos de bananeira resistentes à murcha de *Fusarium*,
66 devido às dificuldades enfrentadas nas técnicas convencionais de melhoramento
67 genético, principalmente porque a maioria das cultivares do gênero *Musa*
68 apresentam níveis elevados de esterilidade e baixa produção de sementes
69 (AMORIM et al., 2011; KHAYAT et al., 2011).

70 Diante disso, a utilização de variação somaclonal, é uma possível ferramenta
71 para o desenvolvimento de genótipos com resistência a variantes do patógeno. Essa
72 ferramenta se refere à ocorrência de alterações genéticas induzidas pelo cultivo *in*
73 *vitro*, e a partir da utilização de reguladores vegetais (SAHIJRAM et al., 2003).

74 Os variantes somaclonais podem apresentar características úteis ao
75 melhoramento vegetal. A indução de variação somaclonal permite a obtenção de
76 genótipos com características de interesse, neste caso, visando à geração de
77 variantes com resistência à murcha de *Fusarium*, que é uma das principais
78 limitações fitossanitárias da cultura da bananeira. Genótipos de bananeira
79 resistentes a raça 4 de *Foc*, já foram desenvolvidos com essa ferramenta em Taiwan
80 (HWANG e KO, 2004).

81 Diante disso, o objetivo deste trabalho foi induzir e selecionar variantes
82 somaclonais de bananeira ‘Prata-Anã’, resistentes à murcha de *Fusarium* raça 1.

83 MATERIAL E MÉTODOS

84

85 Foram utilizadas plantas da cultivar “Prata Anã” (grupo genômico AAB),
86 obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

87 Indução de variação somaclonal

88

89 Ápices caulinares foram cultivados em meio de cultura MS (Murashige e
90 Skoog, 1962) no escuro durante 15 dias e transferidos para o claro por mais 15 dias
91 em temperatura de 27 °C. Em seguida, foram transferidos para o meio MS
92 suplementado com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina BAP (4 ml.L⁻¹),
93 Thidiazuron TDZ (1 ml.L⁻¹) e Paclobutrazol PBZ (10 ml.L⁻¹), sendo os seguintes
94 tratamentos:

Tratamentos	Regulador vegetal
0	Sem regulador
1	6-benzilaminopurina BAP (4 ml.L ⁻¹)
2	Thidiazuron TDZ (1 ml.L ⁻¹)
3	Paclobutrazol PBZ (10 ml.L ⁻¹)
4	6-benzilaminopurina BAP (4 ml.L ⁻¹) + Thidiazuron TDZ (1 ml.L ⁻¹)
5	6-benzilaminopurina BAP (4 ml.L ⁻¹) + Paclobutrazol PBZ (10 ml.L ⁻¹)
6	Thidiazuron TDZ (1 ml.L ⁻¹) + Paclobutrazol PBZ (10 ml.L ⁻¹)
7	6-benzilaminopurina BAP (4 ml.L ⁻¹) + Thidiazuron TDZ (1 ml.L ⁻¹) + Paclobutrazol PBZ (10 ml.L ⁻¹)

95

96 Os subcultivos foram realizados em intervalos de 30 a 40 dias, sendo
97 realizados 12 subcultivos. Ao fim dos subcultivos os brotos foram individualizados
98 e transferidos para o meio MS sem o acréscimo de reguladores. Após 30 dias as
99 plantas enraizadas foram transferidas para tubetes e aclimatadas em casa de
100 vegetação por 30 a 45 dias, até atingirem aproximadamente 15 cm de altura.

101 Seleção de variantes somaclonais com resistência a *Foc*

102

103 O isolado CNPMF 218A de *Foc* raça 1, obtido da “Coleção biológica de
104 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* do Laboratório de fitopatologia” (HADDAD et
105 al., 2011, COSTA et al., 2015) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das
106 Almas, BA, foi utilizado para os testes de resistência. Esse isolado de *Foc* foi
107 selecionado por apresentar maior agressividade em cultivares de bananeira, em
108 trabalhos já realizados pela equipe.

109 O inóculo foi produzido a partir da repicagem do isolado 218A de *Foc*, em
110 placas contendo meio de cultura BDA as mesmas foram incubadas em BOD, com
111 temperatura de 25°C e fotoperíodo 12 horas. Após 8 dias crescido o fungo, foi feita
112 uma suspensão de conídios do isolado. Esta suspensão (20 ml) foi semeada em 1kg
113 de arroz devidamente esterilizado. Posteriormente o meio de cultivo (arroz)
114 inoculado foi incubado em BOD, com temperatura de 25°C e fotoperíodo 12 horas.
115 Após 20 dias foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), a
116 concentração foi ajustada para de 10⁶ UFC/g. Caixas D'Água de Polietileno com
117 capacidade para 310 litros foram preenchidas com solo e infestadas com 1kg de
118 inóculo por caixa, sendo utilizadas 30 caixas para montagem do experimento em
119 casa de vegetação. O solo foi infestado com *Foc* e após 15 dias as mudas foram
120 plantadas nas Caixas D'Água. Foram plantadas 30 mudas por caixa. plantas da
121 cultivar ‘Prata-Anã’ foram plantadas em cada caixa como controle.

122 Após 90 dias ou morte da planta, foi realizada a avaliação do sintoma
123 interno, quanto à descoloração do rizoma segundo escala de notas proposta por Dita
124 et al., (2014), que varia de 1 a 5, sendo 1: Ausência de sintomas; 2: rizoma com
125 descoloração inicial; 3: descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema
126 vascular; 4: rizoma com a maioria dos tecidos internos apresentando necrose; 5:
127 rizoma totalmente necrosado. A escala de notas foi adaptada para o cálculo de ID.
128 A nota 1 foi transformada em 0; 2 em 1; 3 em 2; 4 em 3 e 5 em 4. Uma vez que ao
129 ser inserida nota 1, a formula calcula ID nas notas 0 e conseqüentemente aumenta o
130 ID para todos os resultados. E a partir das notas foi calculado o Índice da doença
131 (ID), baseada na fórmula descrita por Mckinney (1923):

132

ID (%)

$$= \left[\frac{\sum \text{nota da doença} \times \text{número de plantas com a nota da doença} \times 100}{\text{número de plantas avaliadas por genótipo} \times \text{maior nota adotada na escala}} \right]$$

133

134 A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada a
135 partir do desenvolvimento da doença ao longo do tempo, determinado pelas notas
136 de sintomas externos, no decorrer do período de avaliação, foram realizadas 7
137 avaliações no período de 60 dias, sendo uma avaliação por semana, cuja equação é:

$$138 \quad \text{AACPD} = \Sigma [((y_1 + y_2)/2) \cdot (t_2 - t_1)] + [((y_2 + y_3)/2) \cdot (t_3 - t_2)] +$$
$$139 \quad [((y_3 + y_4)/2) \cdot (t_4 - t_3)] + [((y_4 + y_5)/2) \cdot (t_5 - t_4)] + [((y_5 + y_6)/2) \cdot (t_6 - t_5)] +$$
$$140 \quad [((y_6 + y_7)/2) \cdot (t_7 - t_6)].$$

141 Onde y_1 e y_2 são duas avaliações (notas) consecutivas realizadas nos tempos
142 (dias) t_1 e t_2 , respectivamente.

143 A partir da escala de notas propostas por Dita et al. (2014): 1: sem sintomas;
144 2: amarelecimento inicial de folhas velhas; 3: amarelecimento de folhas velhas e
145 descoloração inicial de folhas jovens; 4: amarelecimento intenso de todas as folhas;
146 e 5: plantas mortas.

147 A partir dos índices de doença (ID) e área abaixo da curva de progresso da
148 doença (AACPD) foram realizadas as análises de porcentagem das notas por
149 tratamento, foi feito o Boxplot da área abaixo da curva de progresso da doença
150 (AACPD) e índice de doença (ID). O Heat map de incidência da doença foi
151 elaborado a partir da transformação das notas, em uma matriz binária, 0 para
152 genótipos sem sintomas e 1 para plantas com sintomas da doença. Os dados
153 referentes a cada planta são representados por cores, sendo a verde associada à
154 resistência e a vermelha associada à suscetibilidade. Os resultados foram
155 submetidos à análise de variância, e as médias, agrupadas pelo teste de Scott-Knott,
156 a 5% de significância, no programa R. Os gráficos foram executados no mesmo
157 programa.

158 **Clareamento e coloração de raízes de bananeira**

159

160 Para visualização de estruturas do fungo nas raízes das plantas, fragmentos
161 radiculares de 1-2 cm de comprimento foram coletados para o clareamento e
162 coloração dos tecidos do hospedeiro (PHILLIPS & HAYMANN 1970). Foram
163 coletados fragmentos radiculares de 4 tratamentos (que apresentaram nota 1, sem
164 sintomas da doença) além do controle. Os fragmentos foram adicionados em
165 recipientes contendo solução de KOH 10% (hidróxido de potássio) em banho-maria
166 a 90°C por 1 hora. A solução foi descartada e o material biológico lavado em água
167 até a remoção do KOH. Em seguida as raízes foram transferidas para solução de
168 HCL 1% durante 5 minutos. Posteriormente a solução foi descartada e as raízes
169 coradas em Azul de Tripán em solução de 0,05% lactoglicerol (2:1:1; ácido láctico:
170 glicerina: água) e fervidas em micro-ondas por 40 segundos. Em seguida, o corante
171 foi descartado e as raízes imersas em solução de lactoglicerol (2:1:1; ácido láctico:
172 glicerina: água) para retirada do excesso de corante. Os fragmentos radiculares
173 foram visualizados e microfotografados em microscópio de luz. As variantes
174 somaclonais selecionadas como resistentes, tiveram suas raízes coletadas e
175 observadas nas duas etapas do trabalho.

176 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

177

178 Na primeira etapa foram avaliadas quanto a resistência à *Fusarium*
179 *oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 (*Foc1*) 2.520 variantes somaclonais da cultivar
180 ‘Prata-Anã’, oriundas dos 7 tratamentos, sendo 360 plantas avaliadas por
181 tratamentos. Os variantes resistentes foram selecionados segundo o índice de
182 doença (ID), e avaliados pela escala de notas do sintoma interno e externo (DITA et
183 al. 2014).

184 Na seleção dos variantes somaclonais 2,7% de plantas sem sintomas foram
185 selecionados como resistentes no tratamento 2 (TDZ), 0,5% no tratamento 4
186 (BAP+TDZ), 0,8% no tratamento 5 (BAP+PBZ) e 1,3% no tratamento 6
187 (TDZ+PBZ) (Figura 1). No entanto, no processo de introdução *in vitro* para
188 micropropagação, alguns somaclones apresentaram contaminação e foram
189 descartados. Embora esses variantes somaclonais, selecionados inicialmente como

190 resistentes tenham apresentado contaminação posteriormente no processo de
191 introdução, pode-se notar um atraso no processo de colonização do fungo no tecido
192 vascular da planta, indicando que possivelmente o variante somaclonal desenvolveu
193 um mecanismo de defesa que causou um atraso no aparecimento doença. Porém, é
194 possível que já existissem toxinas no interior dos tecidos do rizoma liberadas pelo
195 fungo, que após serem introduzidas apresentaram contaminação em meio de cultura,
196 pois o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* é um fungo necrotrófico que libera
197 toxinas, com a função de degradar o tecido do hospedeiro (STOVER, 1962;
198 PLOETZ, 2015). Dentre as principais fitotoxinas estão o ácido fusarico e
199 Beauvericin (PORTAL et al., 2018).

200 Com isso, o número de plantas, sem sintomas, consideradas resistentes à
201 murcha de Fusarium que puderam ser micropropagadas foram oito, sendo duas
202 plantas do Tratamento 2 (TDZ); uma planta do Tratamento 4 (BAP+TDZ); uma
203 planta no Tratamento 5 (BAP+PBZ) e quatro plantas no Tratamento 6 (TDZ+PBZ).
204 Na Figura 1 é possível visualizar a porcentagem de cada nota por tratamento.

205 Neste trabalho, todos os 2.520 variantes somaclonais foram submetidos a 12
206 subcultivos antes de serem encaminhados para aclimatação, este fator pode
207 contribuir para a indução de variação somaclonal, visto que, com o aumento do
208 número de subcultivos a taxa de variação somaclonal em plantas micropropagadas
209 também é maior (Santos et al. 2004).

210 Um número reduzido de somaclones sem sintomas da doença foi obtido
211 neste trabalho. Esse resultado é esperado, pois, a indução de variação genética
212 ocorre em porcentagens pouco expressivas. Em um trabalho semelhante a este,
213 desenvolvido em Taiwan, os autores induziram variação somaclonal em 20.000
214 mudas de bananeira Cavendish, as mesmas foram plantadas em campo infestado
215 com o *Foc* TR4, para selecionar genótipos resistentes à murcha de Fusarium. Com
216 esse trabalho, o GCTCV-218, uma variante somaclonal de Cavendish com
217 resistência à *Fusarium*, foi registrado para cultivo comercial com nome de
218 Formosona (HWANG e KO 2004). Outros variantes somaclonais de Cavendish, a
219 saber, GCTCV-53 e GCTCV-119 foram identificadas, e mostraram resistência à
220 murcha de Fusarium (HWANG e KO 2004). Os autores obtiveram cerca de 0,01%

221 de genótipos selecionados com resistência a raça 4 de *Fusarium*. Isso indica uma
222 baixa frequência de mutações que atuam na resistência, sendo necessário um
223 número expressivo de plantas para aumentar as chances de selecionar possíveis
224 variantes somaclonais que sejam resistentes a doença.

225 Na figura 2, o gráfico construído a partir das notas, 0 para os genótipos sem
226 sintomas de doença, e 1 para plantas com sintomas, é possível visualizar a
227 incidência de plantas com sintomas destacadas na cor vermelho, e as plantas que
228 não apresentaram sintomas da doença, apresentadas com a cor verde. Indicando a
229 pequena variabilidade genética ocorrida para o fator de resistência nos 2.520
230 variantes testados.

231 Ocorreu variabilidade genética nos variantes somaclonais T2-1e T2-2 ambos
232 do tratamento 2 (TDZ), indicando que possivelmente a ação do TDZ sem
233 combinações com outros reguladores vegetais no meio de cultura, foi eficaz na
234 obtenção de variantes somaclonais. No trabalho de Goelzer et al., (2019) a
235 combinação de TDZ e ANA exerceu um efeito negativo sobre o crescimento das
236 brotações. Indicando que possivelmente a utilização apenas do TDZ no meio de
237 cultura, intensificou os efeitos da ação de citocinina na divisão celular. A maioria
238 dos trabalhos utiliza o TDZ para indução de organogênese e embriogênese, o TDZ é
239 um fitoregulador do grupo das citocininas, responsável pela divisão celular
240 (PELAH et al., 2002; SHEIBANI et al., 2006 AHMAD et al., 2018). A ação do
241 TDZ no meio de cultura promove um aumento na divisão celular, podendo provocar
242 erros da DNA Polimerase, gerando algum tipo de mutação. Isso possivelmente pode
243 justificar o melhor resultado em se obter possíveis variações genéticas nas plantas
244 do Tratamento T2 (TDZ), o que resultou na obtenção de duas plantas sem sintomas
245 e considerada resistente. Melhor resultado em comparação com os demais
246 tratamentos que tiveram combinações dos reguladores vegetais.

247 Embora a utilização do TDZ tenha alcançado os melhores resultados na
248 seleção de genótipos sem sintomas da doença, isso não significa que o genótipo
249 tenha características agronômicas úteis para o cultivo. Portanto pode ter ocorrido
250 alterações no DNA do variante somaclonal que confirmam características
251 agronômicas indesejáveis, diferenciando-o da cultivar 'Prata-Anã', usada como

252 padrão. Sendo assim, a avaliação das características agronômicas dos genótipos
253 selecionados neste trabalho, deverão ser realizadas posteriormente. Os variantes T2-
254 1, T2-2, T4-1 e T5-1, selecionados como resistentes no primeiro teste, foram
255 multiplicados e seguiram para serem novamente testados (em tanques infestados
256 com *Foc* raça 1) quanto à resistência à murcha de Fusarium.

257 A segunda etapa do trabalho consistiu em testar novamente os somaclones
258 T2-1, T2-2, T4-1 e T5-1, considerados resistentes no primeiro teste. Dez repetições
259 de cada somaclones foram plantados em caixas contendo solo infestado com o
260 patógeno. As raízes desses somaclones foram descoloridas e coradas para
261 observação nas duas etapas do trabalho.

262 Os resultados da segunda etapa do trabalho mostraram que os variantes T2-1
263 e T2-2 não se diferenciaram estatisticamente. Os variantes T4-1 e T5-1 se
264 assemelharam às plantas T0 (controle), segundo o teste de Scott-Knott. Os
265 resultados do ID para os genótipos T4-1, T5-1 e T0 (controle) foram de 40% a 70%,
266 o que indicou suscetibilidade à murcha de Fusarium nesses tratamentos,
267 diferentemente do que ocorreu na primeira etapa. O genótipo T2-1 foi considerado
268 resistente à murcha de Fusarium na primeira etapa e isso foi confirmado na
269 segunda, onde o ID para o genótipo T2-1 foi de 0%. No genótipo T2-2 o ID
270 alcançou 5%, e considerado resistente (Figura 4).

271 Os resultados da AACPD para o genótipo T2-1 e T2-2 foi de 250. Os
272 genótipos T4-1, T5-1 e T0 (controle) tiveram AACPD de 600 a 1500 (Figura 4).
273 Nos genótipos T4-1, T5-1 e T0, foi vista a descoloração do rizoma causado pela
274 doença (Figura 4). Com isso, os genótipos T4-1 e T5-1 foram considerados
275 suscetíveis à murcha de Fusarium no segundo teste.

276 Os genótipos T4-1 e T5-1, avaliados na primeira etapa, não foram
277 representativos, pois ao serem multiplicados novamente, apresentaram sintomas.
278 Logo, esses genótipos não eram resistentes. Acredita-se que tenham ocorrido
279 mutações pontuais nos somaclones T2-1 e T2-2, levando os mesmos a serem
280 resistentes.

281 Diferenças morfológicas nas folhas dos variantes somaclonais foram
282 observadas. Os somaclones T2-1 e T2-2 não apresentaram manchas avermelhadas

283 nas folhas, como foi observado nos somaclones T4-1 e T5-1, manchas semelhantes
284 as da ‘Prata-Anã controle (Figura 5). Indicando que algum tipo de modificação
285 genética ocorreu nos somaclones T2-1 e T2-2. Alguns trabalhos mostram que
286 modificações morfológicas são observadas em bananeiras que sofreram algum tipo
287 de variação somaclonal (Alvares et al., 2002).

288 Os resultados obtidos na observação de estruturas do patógeno nas raízes dos
289 variantes somaclonais selecionadas como resistentes mostraram que todos
290 apresentaram estruturas de *Foc*, como clamidósporos e hifas, exceto o variante T2-1
291 (Figura 3). Indicando a suscetibilidades dos variantes somaclonais T4-1 e T5-1, nos
292 resultados de ID e AACPD (Figura 4). O variante que T2-1 não apresentou
293 estruturas de *Foc* em ambos os testes (Figura 3).

294 No variante T2-1 algum tipo de mecanismo de resistência pré-formado que
295 não permite a penetração do fungo no tecido da raiz pode ter sido ativado, por genes
296 relacionados à resistência, conferindo a este genótipo uma resistência qualitativa. O
297 variante resistente T2-1 pode ter desenvolvido barreiras físicas e químicas para
298 bloquear a invasão do patógeno. Estes incluem o fortalecimento da parede celular
299 por lignificação, formação de papilas nos locais de penetração, acúmulo de tiloses
300 nas células e produção de compostos antifúngicos (PETIT-HOUDENOT et al.,
301 2017; BANI et al., 2018).

302 No variante T2-2 em ambos os testes foram encontrados clamidósporos nas
303 raízes, indicando que esse variante pode ter desenvolvido uma resistência
304 quantitativa ou qualitativa ao patógeno. Genes relacionados aos mecanismos de
305 resistência pós-formados podem ter sido ativados conferindo ao genótipo resistência
306 a murcha de *Fusarium*, pois mesmo após a penetração do fungo nas raízes, o fungo
307 não conseguiu estabelecer o processo completo de infecção.

308 Em trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Programa de
309 Melhoramento de Bananeira da Embrapa (ainda não publicados), alguns resultados
310 mostraram que “Grand Naine” uma cultivar do subgrupo Cavendish com resistência
311 qualitativa a *Foc* raça 1, apresentou estruturas de *Foc* como hifas e clamidósporos
312 no tecidos das raízes, em teste realizado com o mesmo isolado de *Foc* 218A,
313 utilizado neste trabalho (VELAME et al., 2017). Isso indica que o variante

314 somaclonal T2-2 selecionados neste trabalho possuem resistência similar as
315 cultivares do subgrupo Cavendish, as quais da mesma maneira apresentaram
316 estruturas de *Foc* nas raízes. As cultivares do subgrupo Cavendish são cultivadas no
317 Brasil desde 1950, quando *Foc* raça 1 devastou as cultivares do subgrupo Gros
318 Michel, e tiveram que ser substituídas por bananeiras do subgrupo Cavendish, e até
319 o momento tem sido a base de exportação de bananeira no País.

320 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

321

322 Conclui-se com este trabalho que a indução de variação somaclonal pode
323 gerar genótipos resistentes a *Fusarium*. Neste trabalho foram obtidos 0,079% de
324 variantes resistentes. Na avaliação clonal, o variante T2-1 e T2-2 foram
325 selecionados como resistente à doença. O uso de fitoreguladores pode indicar maior
326 eficiência nos resultados neste trabalho, em comparação com o trabalho em Taiwan,
327 no qual não informam a utilização de fitoreguladores vegetais.

328 Os variantes T2-1 e T2-2 selecionados neste trabalho são promissores para
329 novos estudos de caracterização agronômica pelo programa de melhoramento
330 genético de bananeira da Embrapa. Isso permitirá identificar se o genótipo
331 selecionado possui características desejáveis para ser recomendado aos agricultores
332 ou como fonte de resistência para o programa de melhoramento genético. Os
333 resultados atuais e futuros dos estudos sobre os genótipos gerados aqui deste
334 trabalho, terão um impacto significativo no lançamento de uma nova cultivar
335 resistente a murcha de *Fusarium*.

336 **AGRADECIMENTOS**

337

338 Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
339 Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

340 **REFERÊNCIAS**

341

342 AHMAD, N., FAISAL, M., HUSSAIN, S. A., & ANIS, M. Regulation of
343 Morphogenesis and Improvement in Shoot Multiplication in Vitex Species Using
344 Thidiazuron. In: Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator.
345 **Springer**, Singapore, p. 343-349, 2018.

346

347 ÁLVARES, M. C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal
348 em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília DF,
349 v. 37, n. 3, p. 415-420, 2002.

350

351 AMORIM, E. P.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O.; PILLAY, M. Quality
352 Improvement of Cultivated Musa. **Banana breeding: progress and challenges**,
353 New York: CRC Press p. 251, 2011.

354

355 BANI, M., PÉREZ-DE-LUQUE, A., RUBIALES, D., & RISPAIL, N. Physical and
356 chemical barriers in root tissues contribute to quantitative resistance to *Fusarium*
357 *oxysporum* f. sp. *pisi* in pea. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 199,
358 2018.

359

360 COSTA, S.N.; BRAGANÇA, C.A.D.; RIBEIRO, L.R.; AMORIM, E.P.;
361 OLIVEIRA, S.A.S.; DITA, M.A.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium*
362 *oxysporum* f. sp. *ubense* in different regions from Brazil. **Plant Pathology**,
363 Oxford, v. 64, n. 1, p. 137-146, 2015.

364

365 GOELZER, A., DÉO, T. G., LOPES, G. B.; DAMIANI, C. R. O. Berg
366 (Myrtaceae)/Growth regulators in vitro multiplication of
367 *Campomanesia adamantium* (Cambess.) **Brazilian Applied Science Review**,
368 Curitiba, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.

369

370 HADDAD, F.; OLIVEIRA, A.S.S.; PERITO, E.A. (2011). **Coleção Biológica de**
371 **trabalho de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* do Laboratório de**
372 **Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura Cruz das Almas**. Available in:

373 [https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/920961/1/foldercolecaobiologicadetalhodefusariumoxysporumINTERNET2.pdf) doc/9 20961/1
374 /foldercolecaobiologicadetalhodefusariumoxysporumINTERNET2.pdf. Access
375 in: 20, Dec, 2019.

376

377 HWANG S.C. & KO W.H. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt
378 acquired through somaclonal variation in Taiwan. **Plant Disease**, Pilot Knob Rd,
379 v.88, n.6, p. 580-588, 2004.

380

381 KHAYAT, E. & ORTIZ, R. Genetic of important traits in *Musa*. In: Pillay, M.;
382 Tenkouano, A. (Org.) **Banana breeding: progress and challenges**. New York:
383 CRC Press: p.71-83, 2011.

384

385 MCKINNEY, H. H., MCKINNEY, H. H., MCKINNEY, H. H., MCKINNEY, R.
386 V., MCKINNEY, R. H., MCKINNEY, R.; SH, H. Influence of soil, temperature
387 and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*.
388 **Journal of Agricultural Research**, Burlington, v. 26, p.195-217, 1923.

389

390 PELAHA, D., KAUSHIK, R. A., MIZRAHI, Y., & SITRIT, Y. Organogenesis in the
391 vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and**
392 **Organ Culture**, v. 71, n.1, p.81-84, 2002.

393

394 PÉREZ-VICENTE L.; DITA, M.A.; MARTÍNEZ-DE LA, P.E. **Technical Manual:**
395 **Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana**
396 **caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 (TR4)**. Editora
397 FAO, Italy, 2014, 75p.

398

399 PETIT-HOUDENOT, Y., & FUDAL, I. Complex interactions between fungal
400 avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences
401 for disease resistance management. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 8, p.
402 1072, 2017.

403

404 PHILLIPS J.M. & HAYMAN D.S. Improved procedures for clearing roots and
405 staining 437 parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid
406 assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55,
407 n.1, p.158-IN18, 1970.

408

409 PLOETZ, R.C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special
410 reference to tropical race 4. **Crop Protection**, Amesterdã, v. 73, p. 7-15, 2015.

411

412 PORTAL, N.; SOLER, A.; ALPHONSINE, P. A. M.; BORRAS-HIDALGO, O.;
413 PORTIELES, R., PEÑA-RODRIGUEZ, L. M.; WALTON, J. D. Nonspecific toxins
414 as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp.
415 *cubense* race 1. **Plant Pathology**, v. 67, n. 2, p. 467-476, 2018.

416

417 REBOUÇAS, T. A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, S. A. S.;
418 LEDO, C. A. S.; AMORIM, E. P. Identification of banana genotypes resistant to
419 Fusarium wilt race 1 under field and greenhouse conditions. **Scientia**
420 **Horticulturae**, v. 239, p. 308-313, 2018.

421

422 SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Analyzing somaclonal
423 variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular &**
424 **Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 6, p. 551-556, 2003.

425

426 SANTOS, C.C.; VIEGAS, R.; HERCÍLIO, P. Variação somaclonal em mudas
427 micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2,
428 p. 201-205, 2004.

429

430 SHEIBANI, M., NEMATI, S. H., DAVARINEJAD, G. H., AZGHANDI, A. V., &
431 HABASHI, A. A. Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron
432 (TDZ). In: **II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739**,
433 2006. p. 259-267.

434

435 STOVER, R.H. Studies on Fusarium wilt of bananas: VIII. Differentiation of clones
436 by cultural interaction and volatile substances. **Canadian Journal of Botany**, v. 40,
437 n. 11, p. 1467-1471, 1962.

438

439 VELAME, K. V. C. **Genes de bananeira candidatos à resistência a murcha de**
440 **Fusarium raça 1 e caracterização da agressividade e virulência de isolados do**
441 **fungo**. 2017. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de
442 Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

443

444 ZHENG, S. J.; GARCÍA-BASTIDAS, F. A.; LI, X. D.; ZENG, L., BAI, T. T.; XU,
445 S. T.; YIN, K. S.; LI, H. X. X.; FU, G.; YU, Y.C.; YANG, L.; NGUYEN, H.C.;
446 DOUANGBOUPHA, B.; KHAING, A. A.; DRENTH, A.; SEIDL, M. F.; MEIJER,
447 H. G. J.; KEMA, G. H. J. New incursions of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*
448 tropical Race 4 across the Greater Mekong Subregion. **Frontiers in Plant Science**,
449 Lausanne, v. 9, p. 457, 2018.

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464 **FIGURAS**

465

466

467

468

469

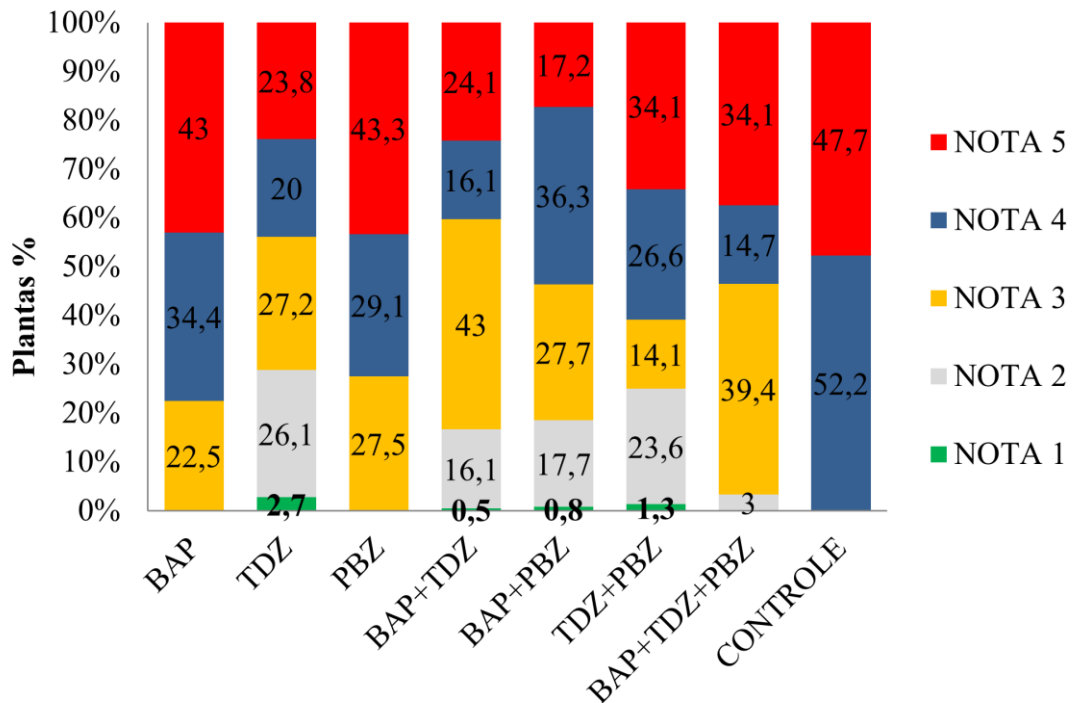


Figura 1. Frequência de plantas por notas. Plantas da cultivar ‘Prata-Anã’, induzidas a variação somaclonal com o uso de fitoreguladores, para seleção de resistência à murcha de Fusarium . Controle (‘Prata-Anã’); BAP: 6-benzilaminopurina; TDZ: Thidiazuron; PBZ: Paclobutrazol; BAP+TDZ: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; BAP+PBZ: 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol; TDZ + PBZ: Thidiazuron + Paclobutrazol; BAP+TDZ+PBZ: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron + Paclobutrazol. Plantas com Nota 1: Ausência de sintomas; Nota 2: rizoma com descoloração inicial; Nota 3: descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema vascular; Nota 4: rizoma com a maioria dos tecidos internos apresentando necrose; Nota 5: rizoma totalmente necrosado (Dita et al. 2014).

470

471

472

473

474

475

476

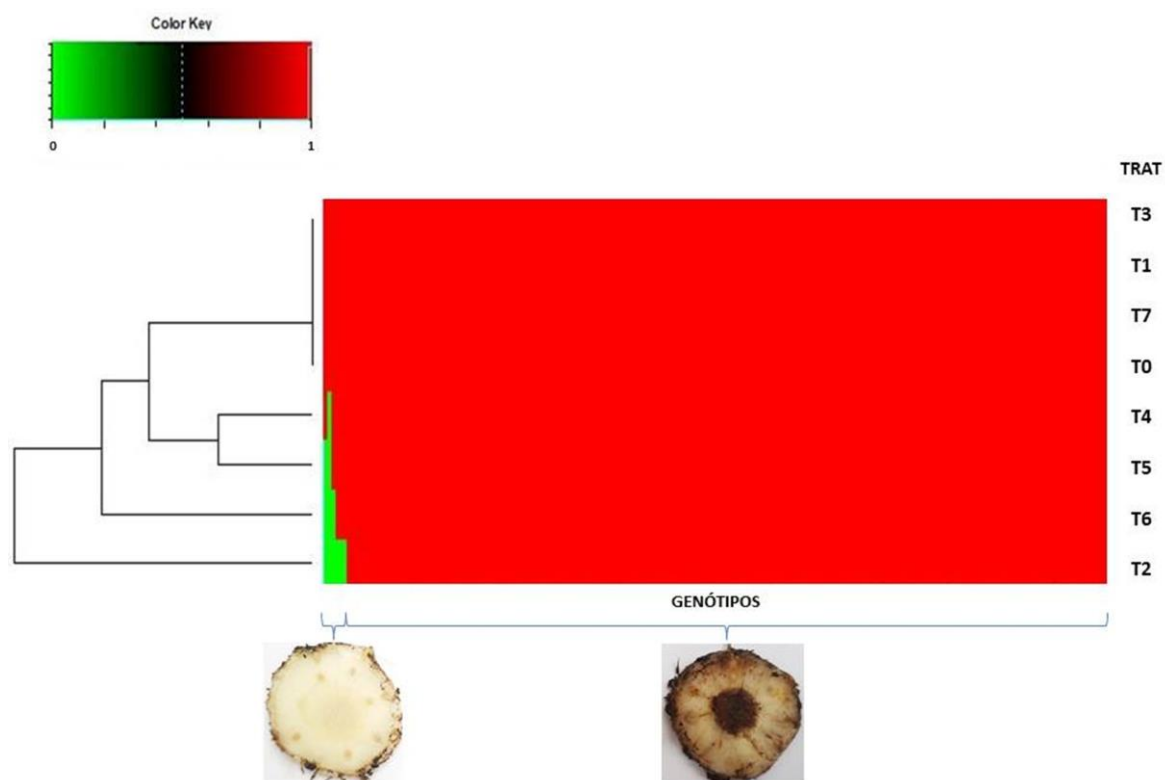


Figura 2. Heat map da presença (vermelho) e ausência (verde) de sintomas de murcha de *Fusarium* em variantes de bananeira “Prata-Anã” testados em casa de vegetação após indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* raça 1 por variação somaclonal com fitoreguladores. O agrupamento hierárquico dos tratamentos é demonstrado pela árvore à esquerda. T0: controle (‘Prata-Anã’); T1: 6-benzilaminopurina; T2: Thidiazuron; T3: Paclobutrazol; T4: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; T5: 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol; T6: Thidiazuron + Paclobutrazol; T7: 6-benzilaminopurina + Thidiazuron + Paclobutrazol; TRAT: tratamentos.

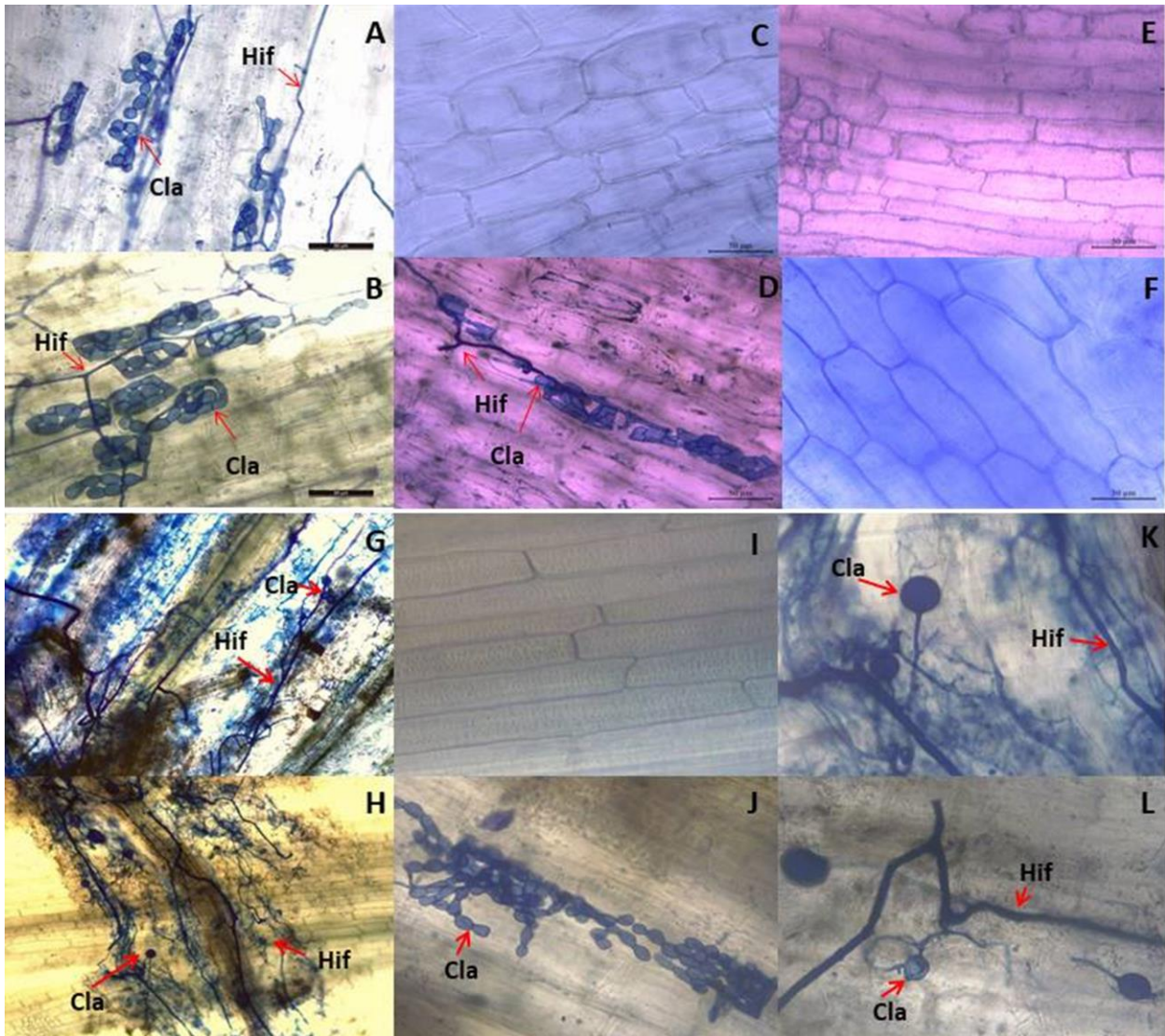


Figura 3. Observação microscópica do tecido de raízes de plantas de bananeira “Prata-Anã” induzidas por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. Primeira etapa do trabalho. As raízes foram clarificadas e as estruturas do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foram coradas com Azul de Tripán. Controle ‘Prata-Anã’ sem indução, com colonização e esporulação do patógeno no tecido (A e B); variante T2-1 induzido com Thidiazuron (C); variante T2-2 induzido com Thidiazuron (D); variante T4-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (E); variante T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol. Cla: clamidósporos; Hif: hifas. Segunda etapa do trabalho: controle ‘Prata-Anã’ sem indução, com colonização e esporulação do patógeno no tecido (G e H); variante T2-1 induzido com Thidiazuron (I); variante T2-2 induzido com Thidiazuron (J); variante T4-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (K); variante T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol (L). Cla: clamidósporos; Hif: hifas.

477

478

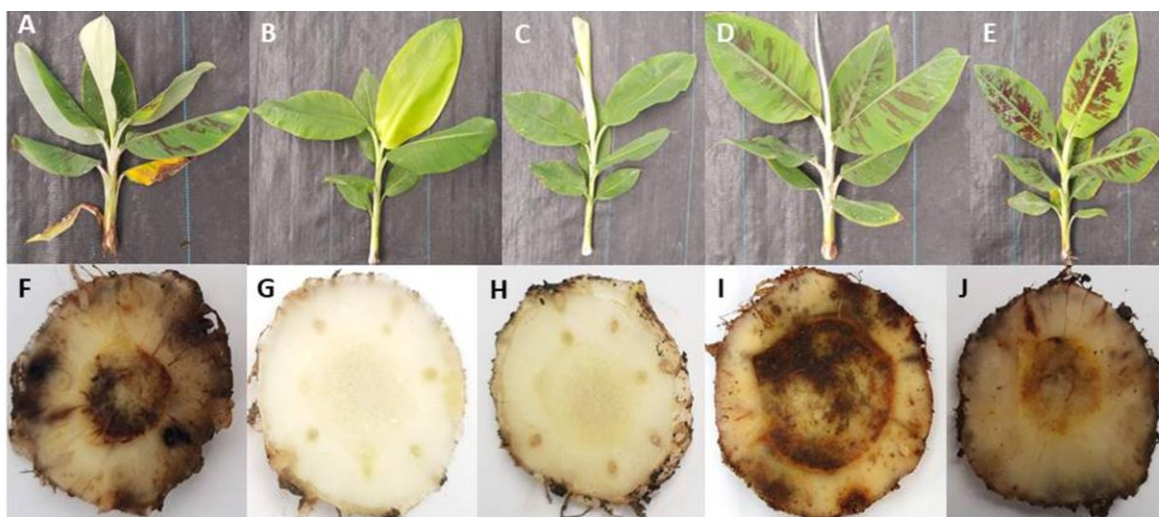
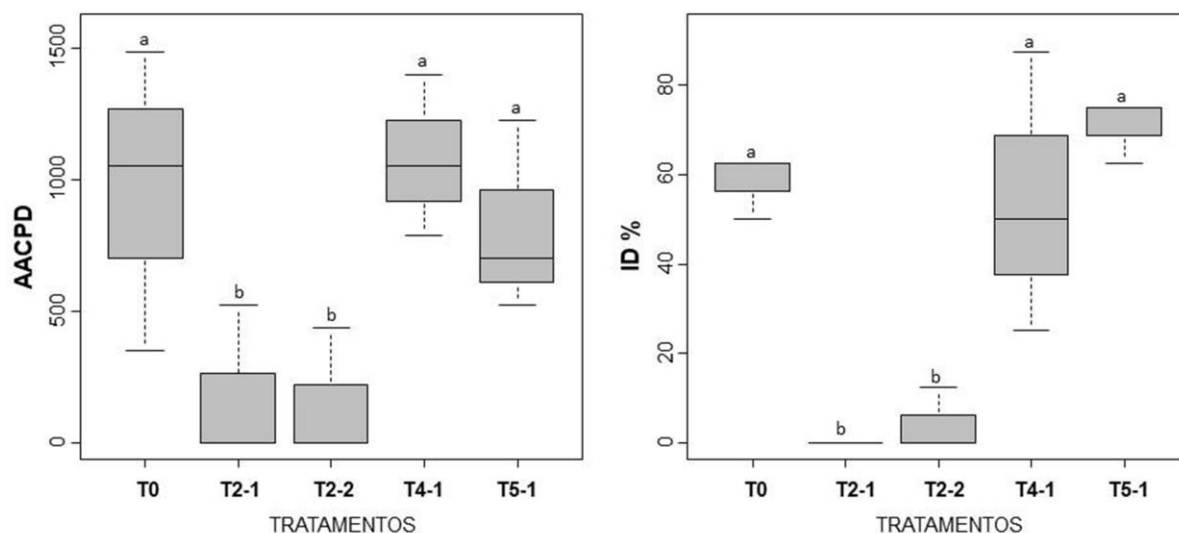


Figura 4. Boxplots da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e índice de doença (ID) de plantas de bananeira “Prata-Anã”, avaliadas em casa de vegetação, após indução por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. T0: controle ‘Prata-Anã’ sem indução; T2-1: variante induzido com Thidiazuron; T2-2: variante induzido com Thidiazuron; T4-1: variante induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron; T5-1: variante induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol. As barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Os sintomas externos típicos de amarelecimento foliar são exibidos de A à E. Corte transversal do rizoma demonstrando os sintomas internos de F à J. As plantas foram avaliadas 90 dias após inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 em casa de vegetação. “Prata-Anã” (Controle suscetível) (A, F); variante T2R1 induzida com Thidiazuron (B,G); variante T2R2 induzida com Thidiazuron (C,H); variante T4R1 induzida com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron (D,I); variante T5R1 induzida com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol (E,J).

480

481

482



Figura 5. Observação morfológica do tecido foliar de plantas de bananeira “Prata-Anã” induzidas por variação somaclonal com fitoreguladores para resistência a murcha de *Fusarium*. Controle ‘Prata-Anã’ sem indução, apresenta manchas avermelhadas na superfície da folha (A); variante T2-1 induzido com Thidiazuron, não apresenta manchas na superfície foliar (B); variante T2-2 induzido com Thidiazuron, não apresenta manchas na superfície foliar (C); variante T4-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Thidiazuron, apresenta manchas avermelhadas na superfície foliar semelhantes a ‘Prata-Anã’ controle (D); variante T5-1 induzido com 6-benzilaminopurina + Paclobutrazol, apresenta manchas avermelhadas na superfície foliar semelhantes a ‘Prata-Anã’ controle (E).